

Aus dem Veterinär-Anatomischen Institut der Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. J. Frewein)

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. P. Wild

Mikrowellen als Hilfsmittel zur Erhaltung der Ultrastruktur von Hepatozyten

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität Zürich

vorgelegt von
Markus Krähenbühl
Tierarzt
von Trub BE

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. J. Frewein, Referent
Prof. Dr. A. Pospischil, Korreferent

Zürich 1988

Druck: Genossenschaft Felicitas



meinen Eltern gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Veterinär-Anatomischen Institut der Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. J. Frewein)

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. P. Wild

MIKROWELLEN ALS HILFSMITTEL ZUR ERHALTUNG

DER ULTRASTRUKTUR VON HEPATOZYTEN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität Zürich

vorgelegt von
Markus Krähenbühl
Tierarzt
von Trub BE

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. J. Frewein, Referent
Prof. Dr. A. Pospischil, Korreferent

Zürich 1988

Druck: Genossenschaft Felicitas

1	<u>Zusammenfassung</u>	1
2	<u>Einführung</u>	3
2.1	Zweck der Fixation	3
2.2	Allgemeine Probleme der Fixation	3
2.3	Mikrowellen	6
2.3.1	Eigenschaften von Mikrowellen	6
2.3.2	Mikrowellenfixation	9
3	<u>Material und Methoden</u>	11
3.1	Tiere	11
3.2	Mikrowellengeräte	11
3.2.1	Miele M 696	11
3.2.2	Magnetron mit Hohlleiter	11
3.3	Versuchsanordnung	12
3.3.1	Vorbereitung der Ratte	12
3.3.2	Probeentnahme	12
3.3.3	Fixation	12
3.3.4	Entwässerung und Einbettung	14
3.3.5	Auswertung	14
4	<u>Resultate</u>	15
4.1	ohne chemische Primär- und Postfixation	15
4.2	Fixation mit Glutaraldehyd	15
4.3	Fixation mit Osmiumtetroxid	15
4.4	Fixation mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid	17
	Tabellen	19
	Fotografien	25
5	<u>Diskussion</u>	31
6	<u>Literatur</u>	39

1 Zusammenfassung

Der Einsatz von Mikrowellen in Kombination mit chemischen Fixativen verbessert die Erhaltung von zellulären Membranen. Eine wichtige Voraussetzung ist die Verwendung von geeigneten Puffern - z.B. Na-K-Phosphat und Na-Cacodylat -, wobei die optimalen Fixationsbedingungen nicht für alle Zellbestandteile gleich sind.

Die beste Strukturhaltung von Rattenleberzellen erzielt man durch eine Erwärmung der sie umgebenden Pufferlösung auf 50-55 °C mit Mikrowellen und anschliessender Osmifikation. Der Einsatz von Wärme beschleunigt die Wirkung von Glutaraldehyd, wobei sich dieser Effekt auf die äussersten Zellschichten einer Probe beschränkt. Eine Erwärmung im Wasserbad auf die gleiche Temperatur ergibt eine weniger regelmässige Fixation. Puffert man das Osmiumtetroxid mit Na-Cacodylat, so wird mit den verwendeten Kontrastmitteln das Glykogen nicht oder nur schlecht sichtbar gemacht.

Die Mikrowellenbestrahlung erweitert die Möglichkeiten für Immersionsfixationen:

1. Durch Mikrowellenbestrahlung in einem geeigneten Puffer erreicht man eine Stabilisation der Membranen. Das ermöglicht einen Verzicht auf die Glutaraldehydprimärfixation, ersetzt aber nicht die Osmiumtetroxidnachfixation.

2. Mit Hilfe der Mikrowellenbestrahlung während der Immersionsfixation mit Glutaraldehyd kann die Fixationszeit auf wenige Minuten reduziert werden. Dabei erreicht man unter optimalen Bedingungen eine Strukturhaltung wie bei einer guten Perfusionsfixation, allerdings mit dem Nachteil, dass dies nur für ein paar Zellschichten in der Peripherie einer Gewebeprobe gilt.

2 Einführung

2.1 Zweck der Fixation

Ziele der Fixation sind: die Erhaltung von zellulären Strukturen, Enzymaktivitäten und antigenen Eigenschaften, die Retention löslicher Substanzen und das Stoppen von zellulären Prozessen wie z.B Stoffwechsel und Membrantransport.

Fixationsmethoden, welche eine optimale Strukturhaltung zum Ziel haben, blockieren z.B. gleichzeitig oft die Enzyme. Deshalb schliessen sich diese Forderungen zum Teil aus. Es ist daher sinnvoll, für jede Fragestellung die spezifisch beste Methode anzuwenden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der optimalen Erhaltung der Ultrastrukturen in Leberzellen der Ratte.

2.2 Allgemeine Probleme der Fixation

Es gibt bis heute keine universelle Fixation, welche für alle Gewebe und für alle Strukturen der Zelle in gleichem Masse gut geeignet ist. Um autolytischen Prozessen zuvorzukommen, sollte die Fixation möglichst unmittelbar an die Probenentnahme anknüpfen und in kürzester Frist erfolgen. Das Ziel ist eine einfach auszuführende, alle Gewebeschichten gleich erfassende Fixation, die in möglichst kurzer Zeit und mit minimaler Umweltbelastung zu einer optimalen Strukturhaltung führt.

Eine einfache und gute Möglichkeit der Erhaltung der Ultrastruktur besteht in der chemischen Vernetzung von Proteinen und Lipiden. Für die Lichtmikroskopie wird dazu meistens Formaldehyd verwendet. Die Qualität der Fixation ist eher bescheiden, doch ist diese Methode einfach und hat sich seit rund einhundert Jahren bewährt. In der Regel genügt sie den Anforderungen in der Lichtmikroskopie, da wegen dem auf $0.2 \mu\text{m}$ limitierten Auflösungsvermögen Feinheiten ohnehin nicht sichtbar gemacht werden können.

Für die biomedizinische Elektronenmikroskopie fixiert man im allgemeinen ebenfalls chemisch. Wegen des höheren Auflösungsvermögens vermag die einfache Formaldehydfixation den gesteigerten Ansprüchen nicht zu genügen. Man wendet in der Regel eine Primärfixation mit Glutaraldehyd und eine Postfixation mit Osmiumtetroxid an. Für die Konzentrationen von Glutaraldehyd, Puffern, Osmiumtetroxid und Zusätzen wie Ionen gibt es eine Vielzahl von Rezepten (Hayat, 1981; Lin und Sommerfeld, 1978; Boon und Kok, 1987; Wild et al., 1987a), je nach Gewebe, Fixation und Fragestellung.

Die chemische Fixation erfolgt während der Immersion des Gewebes von aussen nach innen. Limitierender Faktor für die Fixationsdauer und -tiefe ist das Diffusionsverhalten und die Reaktionsgeschwindigkeit des Fixationsmittels. So ist z.B. die Diffusionsgeschwindigkeit von Formaldehyd hoch, jedoch fixiert es sehr langsam. Im Gegensatz dazu reagiert Glutaraldehyd schneller, penetriert aber langsamer ins Gewebe (Fox et al., 1985).

Die beste chemische Fixation erreicht man mit der Perfusion, d.h. mit der direkten Infusion der Fixationslösung in die Blutbahn. Dies ist jedoch bei grösseren Tieren meist unpraktisch und für Biopsien nicht möglich.

Die in der Routinefixation in beträchtlichen Mengen verwendeten Chemikalien sind Umweltgifte, welche auch in der Öffentlichkeit in Frage gestellt werden. Ein Ersatz durch umweltfreundliche Methoden drängt sich immer dringender auf.

Alternative Methoden beruhen auf dem Einsatz von Hitze oder Kälte.

Mit der Gefrierfixation erreicht man gute Resultate. Innert kurzer Zeit, d.h. innert einigen Millisekunden, können mit dieser Methode Zellen stabilisiert und somit in einem möglichst lebensnahen Zustand erhalten werden. Eine der Schwierigkeiten dieser Methode besteht darin, dass nur die äusserste, 10-20 µm dicke Schicht optimal eingefroren werden kann (Robards und Sleytr, 1985), ausser man gefriert unter einem Druck von 2100 atm (Moor, 1971; Müller und Moor, 1984). Diese Methode ist sehr aufwendig, zudem ist die Fixationsqualität nicht in der ganzen Organprobe optimal (Marti et al., 1987).

Die Fixation durch Hitze ist beinahe ebenso alt wie diejenige durch Formaldehyd. Ehrlich und Lazarus verwendeten sie schon 1898 für Blutausstriche (Hopwood et al., 1984). In der Bakteriologie werden Ausstriche von Bakterienkulturen auf Objektträgern routinemässig mit Hitze fixiert. In beiden Fällen handelt es sich um gleichmässige, dünne Proben. Da Gewebeproben normalerweise wesentlich dicker sind als Ausstriche, besteht hier das Problem, dass infolge der langsamen Wärmekonvektion die äusseren Zellschichten durch die Hitze schon zerstört werden, bevor sich das Zentrum zu erwärmen beginnt.

Mikrowellen haben die Eigenschaft, in die Gewebe einzudringen und diese direkt, ohne Konvektion, gleichzeitig sowohl an der Oberfläche als auch im Innern zu erwärmen. Diese Eigenschaft macht sie für eine Hitze-fixation von grösseren Proben interessant.

Will man im histologischen Labor mit Mikrowellen arbeiten, so ist es sinnvoll, sich zuerst mit ihrem Wesen auseinanderzusetzen.



2.3 Mikrowellen

2.3.1 Eigenschaften von Mikrowellen

Mikrowellen gehören zu den elektromagnetischen Wellen. Sie umfassen den Frequenzbereich von 2×10^9 bis 3×10^{11} Hz. Zur Veranschaulichung des Spektrums elektromagnetischer Wellen soll diese Tabelle dienen (Suess, 1982):

	Frequenz	Wellenlänge
Funk	10 kHz	30 km
Radio (FM)	100 MHz	3 m
Mikrowellen	2450 MHz	12.2 cm
Radar	10 GHz	3 cm
Infrarot	10^{14} Hz	3 μ m
Licht (gelb)	5×10^{14} Hz	600 nm
Ultraviolett	10^{16} Hz	30 nm
Röntgen	10^{18} Hz	0,3 nm
γ -Strahlung	10^{20} Hz	3 pm

Bei den angegebenen Frequenzen handelt es sich jeweils um ein Beispiel aus dem entsprechenden Bereich, der bis drei Zehnerpotenzen umfassen kann und dessen Grenzen nicht genau definiert sind.

Die elektromagnetischen Wellen breiten sich im Vakuum und in der Luft mit einer Geschwindigkeit von rund 3×10^8 Metern pro Sekunde aus ("Lichtgeschwindigkeit"). Den Zusammenhang zwischen Frequenz und Wellenlänge zeigt die Formel $v = \lambda \times f$ (Geschwindigkeit gleich Frequenz mal Wellenlänge), die Frequenz und die Wellenlänge sind somit umgekehrt proportional.

Alle elektromagnetischen Wellen haben sowohl "Teilchen"- wie auch Wellencharakter. Die Energie dieser "Teilchen" - der Photonen - beträgt $\epsilon = h \times f$ (Höfling, 1962).

Dabei ist f die Frequenz und h das Planck'sche Wirkungsquantum ($h = 6.625 \times 10^{-34}$ Joulesekunden).

Aus der Gleichung $\epsilon = h \times \nu$ ist ersichtlich, dass die Energie proportional zur Frequenz ist. Hochfrequente (kurzwellige) Wellen - z.B. Röntgen- und γ -Strahlen - sind energiereicher, Wellen mit niedriger Frequenz und grosser Wellenlänge wie z.B. Radio- und Mikrowellen haben weniger Energie.

Für Mikrowellen beträgt die Energie eines Photons ($\epsilon = h \times \nu$) bei einer Frequenz von 2450 MHz:

$$6.625 \times 10^{-34} \text{ Js} \times 2.450 \times 10^9 \text{ Hz} = 1.62 \times 10^{-24} \text{ J}$$

oder rund 10^{-5} eV (= Elektronenvolt, 1 eV ist die kinetische Energie, die ein Elektron beim freien Durchlaufen einer Spannung von 1 Volt gewinnt).

$$1 \text{ eV} = 1.602 \times 10^{-19} \text{ Joule (Lowe, 1975)}$$

Oft findet man auch die Leistungsdichte in Watt pro Fläche angegeben. So beträgt z.B. der von der WHO empfohlene Grenzwert für eine Ganzkörperdauerbestrahlung 5 mW pro cm^2 (Michaelson, 1982).

Treffen elektromagnetische Wellen auf Materie, so gibt es - vereinfacht ausgedrückt - drei Möglichkeiten für Interaktionen: die Reflexion, die Absorption und die Transmission. Welche dieser Möglichkeiten dominiert, hängt im wesentlichen von der Zusammensetzung der Materie und von der Frequenz - und somit von der Energie - der elektromagnetischen Wellen ab.

Theoretische, ideale Leiter reflektieren alle Strahlen vollständig, während diese in idealen Dielektrika ungehindert durchtreten können. Gute Leiter wie Metalle lassen geringe Penetrationstiefen zu, vor allem für hochfrequente, energiereiche Strahlen wie Gamma- und Röntgenstrahlen. Die Wellen von Radio und Funk sowie Mikrowellen können nur in die aller oberste Schicht eindringen und werden grösstenteils reflektiert.

Biologische Gewebe sind schlechte Leiter. Bei ihnen ist die Penetrationstiefe gross. Mikrowellen, Infrarot, Licht und UV dringen ein und bewirken eine Erwärmung (Verbrennungen, Sonnenbrand) oder im Falle von Ultraviolett über die Aktivierung der Melanozyten eine Hautbräunung. Röntgenstrahlen vermögen sogar durch viele Gewebe hindurchzutreten.

Strahlungen, welche in die Materie eindringen können, werden von dieser entweder ungehindert durchgelassen oder absorbiert. Das hängt davon ab, ob die Welle innerhalb der Materie auf ein schwingungsfähiges System mit der entsprechenden Resonanzfrequenz trifft. Bei den schwingungsfähigen Systemen handelt es sich um polare Moleküle, welche sich nach den Oszillationen der elektromagnetischen Wellen ausrichten. Durch diese Molekülrotationen und -vibrationen kommt es zu einer Erwärmung.

Ein weiterer Mechanismus ist die Anregung von Elektronen, welche auf ein höheres Energieniveau springen und beim Rückfall in den Ausgangszustand zum Beispiel Licht emittieren. In beiden Fällen sind nur die Elektronenhüllen der Atome beteiligt. Im Gegensatz dazu wirken Röntgen- und Gammastrahlen als ionisierende Strahlung auf die Atomkerne.

Das für eine Erwärmung durch elektromagnetische Wellen wichtigste polare Molekül in biologischen Geweben ist das Wasser. Das Sauerstoffatom ist elektronegativer als die beiden H-Atome und deshalb leicht negativ geladen. Da die beiden entsprechend positiv geladenen Wasserstoffatome nicht symmetrisch zu beiden Seiten des Sauerstoffatoms liegen, sondern zueinander einen Winkel von 105° bilden, entsteht ein polares Molekül. Bei Frequenzen unter 200 MHz (z.B. Radio) können sich die Wassermoleküle immer noch dem elektrischen Feld ausrichten, ohne dass es zu einer Energieübertragung kommt. Bei höheren Frequenzen sind diese Dipolrotationen langsamer als die Feldoszillationen, die Moleküle werden beschleunigt und gebremst, so dass es zu einer Erwärmung kommt. Bei Frequenzen über 1000 GHz vermögen die H_2O -Moleküle nicht mehr auf die Feldoszillationen zu reagieren und es kommt zumindest über diesen Mechanismus zu keiner Erwärmung mehr.

Das Absorptionsmaximum von biologischen Geweben liegt bei etwa 20 GHz. Hier wird die gesamte Energie schon in den äußersten Schichten absorbiert, weshalb die Haushaltsmikrowellengeräte mit der tieferen Frequenz von 2,45 GHz arbeiten.

2.3.2 Mikrowellenfixation

Mayers (1970) fixierte frische Organstücke von 1 cm Kantenlänge mit Mikrowellen für die Lichtmikroskopie. Diese Würfel legte er ohne irgendwelche Puffer- oder andere Lösungen in den Hohlleiter. Bernard (1974) erhitzte ganze Mäuse mit Mikrowellen. Die im Kalorimeter bestimmten Temperaturen lagen im Bereich von 60 bis 90 °C. Bernard fand für verschiedene Organe verschiedene Temperaturoptima. Von Leberproben untersuchte er zusätzlich Schnitte im Elektronenmikroskop. Er konnte die meisten Organellen erkennen, fand jedoch eine Verklumpung von Zytoplasma und Chromatin. Eine zusätzlich Nachbehandlung in Karnovsky-Fixativ (KF) erwies sich als ungünstig.

Unterdessen gibt es viele Arbeiten, welche zeigen, dass für die Lichtmikroskopie eine Hitzefixation mit Mikrowellen der Formaldehydfixation mindestens ebenbürtig ist (z.B. Login, 1978; Hopwood et al., 1984; Leong et al., 1985; Boon und Kok, 1987).

Für die Elektronenmikroskopie verglichen Login und Dvorak (1985) die Immersionsfixation in KF bei Zimmertemperatur mit solchen bei 50 °C. Diese Temperatur erreichten sie einerseits durch Erwärmung im Wasserbad, andererseits mit Mikrowellen. Letzteres erwies sich als die optimale Kombination. Zusammen mit Stavinoha (1986) reduzierten sie mit einem speziell gebauten Mikrowellengerät mit einem Feldtuner die Bestrahlungsdauer auf 26-90 Millisekunden, mit dem Ziel, die zellulären Prozesse unmittelbar zu stoppen und einen den lebenden Zellen möglichst nahe kommenden Zustand zu erhalten. Als Anwendungsmöglichkeiten erwähnen sie die Untersuchung von vesikulären Transporten und die Erhaltung von wenig stabilen Antigenen und Enzymen. Die dabei erreichten Temperaturen lagen zwischen 32 und 42 °C.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Unsere Biopsien stammten von ungefähr 300 g schweren, männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Stamm Zur: ZIVZ).

3.2 Mikrowellengeräte

3.2.1 Miele M 696

Bei dem für die Versuche verwendeten Gerät handelt es sich um einen gewöhnlichen Haushaltsmikrowellenofen, den Miele M 696. Dieses Gerät hat folgende technische Daten:

verlangte Netzspannung:	220 Volt Wechselstrom (50 Hz)
Leistungsaufnahme:	1900 Watt
Leistungsabgabe:	700 Watt
Frequenz der Mikrowellen:	2450 MHz $\pm$ 50 MHz

3.2.2 Magnetron mit Hohlleiter

Zusätzliche Versuche am Institut für Hochfrequenztechnologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, ETH Zürich, gaben Einsicht in gerätebedingte Einflüsse.

Hier wurde ein direkt mit einem Hohlleiter verbundenes Magnetron verwendet. Mit einem Richtkoppler im Hohlleiter und einem Netzwerkanalysator (Hewlett-Packard 8753) ist es möglich, den reflektierten sowie den transienten Anteil der abgegebenen Leistung zu bestimmen. Die Absorption lässt sich dann leicht als Differenz errechnen. Um das Messgerät nicht zu beschädigen, verwendet man dazu eine Ausgangsleistung von wenigen Milliwatt. Die gefundenen Werte gelten unverändert auch für grosse Leistungen, solange es nicht infolge der Erwärmung zum Sieden der Flüssigkeit oder zu chemischen Reaktionen kommt, welche die elektromagnetischen Eigenschaften der Probe verändern.

Für die anschliessenden Versuche kam eine Leistung von 370 Watt zum Einsatz, wovon bei der gewählten Position 47% der Strahlung absorbiert wurden. Wegen den beschränkten Dimensionen des Hohlleiters konnten nur kleine Gläschen mit 5 ml Inhalt verwendet werden.

In zwei Sekunden erreichte die Puffertemperatur rund 55 °C (rund 68 °C in drei Sekunden).

Die Puffertemperatur wurde im Anschluss an die Mikrowellenbestrahlung mit einem schnell reagierenden elektronischen Thermometer gemessen (Platinum Thermometer 737C, Jenco Electronics LTD).

3.3 Versuchsanordnung

3.3.1 Vorbereitung der Ratte

Die Ratten wurden jeweils am Vortag des Versuches ins Labor geliefert. Vor Versuchsbeginn erhielt sie eine Injektion von 6 mg Na-Pentobarbital (Nembutal, Abbott Laboratories) pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal. Die damit erreichte Narkosetiefe ist ein tiefes Toleranzstadium.

3.3.2 Probeentnahme

Nach dem Eintritt der tiefen Narkose wurden die Leberstücke entnommen und anschliessend die Ratte euthanasiert.

Eine gründliche Spulung mit gekühltem (4 °C) PBS reinigte die Proben von Blutresten und schützte sie vor Austrocknung. Danach erfolgte das Zuschneiden zu kleinen Stückchen mit ungefähr 1 mm Kantenlänge.

3.3.3 Fixation

Unmittelbar nach dem Zuschneiden der Proben wurden diese in 10 ml (5 ml für die Versuche an der ETH) der Lösung verbracht, in der die Weiterverarbeitung erfolgte.

Um Aussagen über den Beitrag der Mikrowellen zur Fixation machen zu können, war es zweckmässig, die Proben vier verschiedenen Gruppen zuzuteilen:

1. ohne chemische Primär- und Postfixation (4.1)
2. Glutaraldehydfixation (4.2)
3. Osmiumfixation (4.3)
4. Glutaraldehyd- und Osmiumfixation (4.4)

In jeder Gruppe wurden Versuche bei Zimmertemperatur und mit Mikrowellenerwärmung durchgeführt, sowie Vergleichsproben im Wasserbad auf die gleichen Temperaturen wie im Mikrowellenofen erhitzt. Die Erwärmung erfolgte in der Pufferlösung beziehungsweise in gepuffertem Glutaraldehyd jeweils anschliessend an das Zuschneiden.

Die Proben der vier Gruppen wurden wie folgt verarbeitet:

In der ersten Gruppe lagen die Gewebsstücke während einer bestimmten Zeit in einer Pufferlösung und wurden anschliessend entwässert. In der zweiten Gruppe wurde anstelle der Pufferlösung gepuffertes Glutaraldehyd verwendet. Die Proben der dritten und vierten Gruppe wurden analog zur ersten beziehungsweise zweiten behandelt, zusätzlich wurden diese Proben vor dem Entwässern mit 1% Osmiumtetroxid (ELMIS, Washington, E.M. Grade Purified) in verschiedenen Puffern mit verschiedenen Zusätzen (Tabellen 1-3) während einer Stunde bei Zimmertemperatur nachfixiert.

In Vorversuchen erwiesen sich Puffertemperaturen von 50 bis 55 °C am besten, weshalb in der Folge vorwiegend Temperaturen in diesem Bereich zum Einsatz kamen. Bei der Mikrowellenerwärmung war dazu bei der von uns gewählten Position im Ofen je nach Lösung eine Bestrahlungsdauer von 8 bis 11 Sekunden nötig. Die Verweildauer der Probe in der Lösung betrug zu Beginn der Versuche einige Sekunden bis zwei Stunden. Aufgrund der Resultate wurde in der Folge meist mit einer Immersionszeit von 5 Minuten gearbeitet. Danach folgte die eventuelle Osmiumnachfixation und anschliessend die Entwässerung.

3.3.4 Entwässerung und Einbettung

Die gesamte Weiterverarbeitung erfolgte bei Zimmertemperatur.

Nach der Entwässerung in einer Alkoholreihe (je sieben Minuten in 70%, 80%, 96% und dreimal 100% Alkohol) und in Propylenoxid (zweimal während je 10 Minuten) ruhten die Proben über Nacht in einem Gemisch von Propylenoxid : Epon = 1 : 1. Am nächsten Morgen folgte die Einbettung in Epon mit anschließender Entgasung im Exsikkator bis am Abend. Das Epon polymerisierte im Wärmeschrank bei 60 °C während zweieinhalb Tagen.

3.3.5 Auswertung

Geschnitten wurden die eingebetteten Proben mit einem Ultramikrotom LKB III. Anhand von mit Toluidinblau gefärbten Semidünnschnitten erfolgte am Lichtmikroskop die Selektion für die Ultra-dünnschnitte, welche mit "250-Mesh"-Kupfernetzchen aufgefangen wurden. Das Kontrastieren der Proben erfolgte mit Mg-Uranylacetat (4 Minuten) und Bleizitrat (3 Minuten). In einer Hochvakuumanlage BAE 121 von Balzers mit einer Elektronenstrahlverdampfungseinrichtung erhielten die Proben einen Kohleüberzug von ca. 2 nm Dicke. Die fertigen Schnitte wurden mit einem Elektronenmikroskop EM 201 von Philips beurteilt.

Die erste Auswertung am Licht- und Elektronenmikroskop erfolgte "blind", d.h. ohne Kenntnis der entsprechenden Fixierungsmethode. Dabei wurden die Ultrastrukturen von bei Zimmertemperatur immersionsfixierten und perfusionsfixierten Gewebeproben verglichen mit solchen, die mittels Mikrowellen oder im Wasserbad erwärmt wurden.

4 Resultate

4.1 ohne chemische Primär- und Postfixation

Bei Proben, die für fünf Minuten im Puffer verweilen und ohne Fixation mit Alkohol entwässert werden, kommt es während dieser Phase in gewissem Grade zu einer Alkoholfixation.

Unabhängig vom Einsatz von Mikrowellen, verschiedenen Puffern und Lösungen sind die Ultrastrukturen nicht erhalten. Lichtmikroskopisch sind die Zellgrenzen oft nur schwer erkennbar, das Zytoplasma weist grosse Leerräume auf. Die Kerne sind leer bis auf einige Reste von Nukleolus und verklumptem Chromatin.

Die Mikrowellenbestrahlung alleine bewirkt somit keine Fixation.

4.2 Fixation mit Glutaraldehyd

Die Verwendung von Glutaraldehyd bringt lichtmikroskopisch eine wesentliche Verbesserung. Nach einer Mikrowellenbestrahlung in 2,5% Glutaraldehyd in verschiedenen Puffern sind die Randzonen der Proben im allgemeinen gut fixiert. Im Zentrum finden sich jedoch Verklumpungen von Zytoplasma und Chromatin sowie Leerräume.

Auch wenn das Resultat vor allem im Elektronenmikroskop nicht befriedigt, so zeigt sich doch ein positiver Einfluss sowohl der Mikrowellenbestrahlung wie auch der Zugabe von Kalzium- und Magnesiumionen.

4.3 Fixation mit Osmiumtetroxid

In der dritten Gruppe wurden alle Proben ohne vorangehende Aldehydfixation mit Osmiumtetroxid fixiert. Ausser für bestimmte Fragestellungen wurde für die Osmifikation derselbe Puffer verwendet, der auch für die vorhergehende Mikrowellenbestrahlung beziehungsweise für die Vergleichsversuche zum Einsatz gekommen war.

In dieser Gruppe findet man den grössten Unterschied zwischen den Proben, welche vor der Osmifikation während fünf Minuten bei Zimmertemperatur im Puffer ruhten und denen, welche mit Mikrowellen oder im Wasserbad erwärmt wurden. Verzichtet man auf eine Erwärmung, so ist das Bild stellenweise zwar fast identisch wie bei den erwärmten Proben, daneben findet man aber alle Stufen verminderter Qualität bis zum völligen Strukturverlust einzelner Zellen. Erwärmt man die Proben statt mit Mikrowellen im Wasserbad, so ist die Strukturhaltung in der Peripherie ähnlich, aber im Zentrum deutlich schlechter als nach Mikrowellenbestrahlung. Bei der Verwendung von ungepufferten, isotonischen Chlorid-Alkali(NaCl, KCl, LiCl)-Lösungen während der Mikrowellenbestrahlung weisen die Zellen bereits lichtmikroskopisch (0,9% NaCl) oder dann im Elektronenmikroskop viele Artefakte auf: 1,15% KCl und 1,5% LiCl führen zu Vakuolisierung des Zytoplasmas sowie zum Teil zu Membranrupturen. Ribosomen bleiben nur wenige erhalten, das Glykogen wird nicht sichtbar.

Mit einer Mikrowellenbestrahlung in PBS wird die Ultrastruktur zum Teil gut erhalten, öfters kommt es aber zu Membranrupturen. Die Membranen von Kern und Mitochondrien sind leicht gewellt. Durch Zugabe von je 1mM Erdalkali(Be,Mg,Ca)-Chlorid-Salzen zu PBS (welches bereits 0,8% NaCl enthält) wird Glykogen sichtbar, am meisten mit Berylliumchlorid, am wenigsten mit Kalziumchlorid. Gleichzeitig werden dadurch die erwähnten Artefakte verstärkt. Gelegentlich findet man helle und dunkle Zellen.

Gleichmässiges Zytoplasma, deutliche Golgifelder und viel glattes endoplasmatisches Retikulum (SER) wird gefunden, wenn man das PBS in der Osmiumphase durch 0,1M Na-Cacodylat ersetzt, wobei so das Glykogen kaum sichtbar ist.

Die Puffersubstanzen in PBS sind einige Millimole Na- und K-Phosphat, wobei der relative Anteil von Na-Phosphat höher ist. Verwendet man diese Puffer alleine in der Konzentration von je 0,1 Molar, so erzielt man mit Na-Phosphat eine teilweise bessere Strukturhaltung. Das Glykogen zum Beispiel sieht man nicht. Mit K-Phosphat ist zwar das Glykogen sichtbar, doch sind die Membranen schlechter erhalten.

Die feinste Strukturhaltung erhielten wir mit einer Mikrowellenbestrahlung in 0,1M oder 0,15M Na-K-Phosphatpuffern (pH 7,4). Allerdings sind die Unterschiede sowohl innerhalb der Proben als auch zwischen verschiedenen Proben beträchtlich. Während Kern und Kernmembran, die Zellmembran, die Mitochondrien mit ihren Cristae sowie das Glykogen immer gut erhalten sind, gibt es Zellen, in denen man sehr grosse Golgi-Felder und viel SER sieht, jedoch nur wenig rauhes endoplasmatisches Retikulum (RER) - und umgekehrt. Wenn das SER gut erhalten ist, findet man im allgemeinen immer auch Membranen des Golgiapparates.

Daneben gibt es vor allem im Zentrum, manchmal aber auch in der Peripherie der Proben Zellen, bei denen kaum Golgi-Felder und nur wenig RER zu sehen ist und das Glykogen in grossen Haufen frei in der Zelle zu schwimmen scheint. Die Kerne sind immer fein granuliert, gelegentlich findet man Anschnitte des Nukleolus.

Auf den meisten Schnitten sind hell/dunkel-Zellvariationen zu finden. Oft verlaufen die Membranen der Organellen nicht völlig gerade, sondern sind leicht gewellt.

Im Vergleich zur konventionellen Aldehyd-Osmiumfixation zeigt sich somit ein deutlich anderes Bild. Auffällig ist insbesondere die Homogenität der Kerne, in denen es zu keiner Verklumpung des Chromatins kommt.

Verschiebt man die pH-Werte des Puffers auf ein höheres (pH 8,0) oder tieferes (pH 6,8) Niveau, sieht man bereits im Lichtmikroskop vermehrt Veränderungen, die auf Rupturen der Zellmembranen zurückzuführen sind.

Der Zusatz von 0,25mM Ca und 0,25mM bis 0,5mM Mg verbessert zwar die Erhaltung der Membranen, doch beschränkt sich der positive Einfluss im Wesentlichen auf die Randzone der Proben.

4.4 Fixation mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid

Eine vierte Serie von Proben wurde einer Primärfixation mit Aldehyden und einer Postfixation mit 1% Osmiumtetroxid unterworfen. Im Allgemeinen wurde für beide der gleiche Puffer verwendet. Die Mikrowellenbestrahlung erfolgte jeweils während der Primärfixation.

Generell findet man in dieser Gruppe einen ausgeprägten Unterschied zwischen dem Rand und dem Zentrum der Proben.

Der Vergleich der Glutaraldehyd (GA)-Konzentrationen von 1% und 2,5% zeigt, dass die kleinere Konzentration ein homogeneres Bild ergibt, während mit 2,5% GA die Proben am Rand besser fixiert werden.

Der Zusatz von 2% FA zu 1% GA ist nachteilig, da es zu Membranrupturen und zur Dilatation von SER und RER führt.

Über den Einfluss von Mikrowellen lässt sich ähnliches sagen wie zu Punkt 4.3. Durch die Mikrowellenbestrahlung wird die Fixation verbessert, jedoch beschränkt sich der Effekt auf eine Randzone von 5-10 Zellagen. Mit einer Erwärmung im Wasserbad bleiben sowohl peripher wie im Zentrum weniger Membranen und Organellen erhalten. Der Qualitätsabfall von aussen nach innen ist etwa gleich gross wie nach einer Mikrowellenerwärmung.

Bei der Verwendung von 0.1M Na-Cacodylat als Puffer während der Osmifikation ist, im Gegensatz zur Verwendung von Na-K-Phosphat oder PIPES, das Glykogen nicht oder kaum zu sehen, und zwar unabhängig davon, ob eine chemische Primärfixation oder eine Mikrowellenbestrahlung stattgefunden hat. PAS-Färbungen von Semidunnschnitten zeigen jedoch, dass das Glykogen in diesen Präparaten vorhanden ist.

Bei der Perfusion mit 2,5% GA gefolgt von einer Osmifikation erreicht man etwa eine gleich gute Fixation wie bei der Mikrowellenbestrahlung im gleichen Medium. Ein Unterschied besteht darin, dass bei einer erfolgreichen Perfusion nicht nur die äussersten Zellagen gut fixiert sind, sondern der grösste Teil der Gewebeprobe.

Tabelle 1

MW-Bestrahlung in verschiedenen Phosphatpuffern mit anschliessen- der Osmifikation.

A) Osmifikation im gleichen Puffer wie MW-Bestrahlung

0,1M NaKP, Zusatz von hauptsächliche Effekte

Ca/Mg in mM

0	/0	-Me leicht gewellt, wenig Rupturen;
0.25	/0,25-0,5	RER gut erhalten; SER nur teilweise er- halten; G intensiv kontrastiert.
0	/0,25-0,5	-Me leicht gewellt, meist deutlich kon- trastiert, vermehrt Rupturen,
0.25	/0	
0,5	/0-1	hell/dunkel-Zellvariationen.

höhere Ca/Mg-Konz. -zunehmend Rupturen und hell/dunkel-
Zellvariationen.

0,15M NaKP

-Me wenig Rupturen, deutlich, leicht
gewellt; Mi, RER, gut erhalten; G gut
kontrastiert.

0,2M NaKP

-Me stärker gewellt als oben; starke
hell/dunkel- Zellvariationen.

PBS -Me gewellt, vermehrt Rupturen; G schlecht kontrastiert; gelegentlich hell/dunkel-Zellvariationen.

PBS, Zusatz von -Glykogen kontrastiert besser, aber die
1mM Be od. Mg od. Ca oben erwähnten Artefakte werden häufiger.

NaP/KS, Konz. in M

0,1 /0,1 -Me gewellt, Rupturen: ZP teilweise herausgelöst.

0,1 /0,05 -Me deutlich, wenig Rupturen; ZP dicht;
 0,05/0,1 hell/dunkel- Zellvariationen

0,1 -Me deutlich, leicht gewellt; G schlecht kontrastiert.

B) MW-Bestrahlung in 0,1M NaKP, Osmifikation in anderem Puffer

Puffer für Osmium hauptsächliche Effekte

0,15M NaKP -Me wenig Rupturen, leicht gewellt, ZP dicht

0,2 M NaKP -Me häufiger Rupturen, ZP vakuolisiert

PBS -Me deutlich, wenig Rupturen, ZP locker

0,1M Caco, Zusatz von
 Ca/Mg in mM

0,25/0,5 -je Me deutlich, leicht gewellt,

0,5 /1 G schlecht kontrastiert

Tabelle 2

MW-Bestrahlung in ungepufferten isotonischen Lösungen mit anschließender Ösmifikation.

Salzlösungen: für MW und Os hauptsächliche Effekte

0.9 % NaCl	-totaler Zusammenbruch der Zellstrukturen
1.15 % KCl; 1.5 % LiCl	-ZP vakuolisiert, Me oft Rupturen, nur wenig Ribosomen erhalten. Glykogen nicht abgebildet

Saccharose-Bleilösungen:

A) MW, Os in 0.1M NaKP

10% Saccharose + 0.1mM $Pb(NO_3)_2$	-grosse Lücken im ZP; Me deutlich, aber viele Rupturen Kerne unregelmässig geformt
10% Saccharose + 0.5mM $Pb(NO_3)_2$	-Kerne homogen, ohne Chromatinklumpen; Me deutlich,
10% Saccharose + 1 mM $Pb(NO_3)_2$	starke Kontraste, alle Organellen gut fixiert, starke hell/dunkel- Zellvariationen; Pb- Niederschläge
10% Saccharose + 5 mM $Pb(NO_3)_2$	-bereits im LM sind viele Artefakte zu sehen

Saccharose-Bleilösung:

B) ohne MW, Os in 0.1M NaKP

10% Saccharose + 1 mM $Pb(NO_3)_2$	-Me sehr deutlich; ebenso alle Organellen; starke 5 Minuten Minuten bei ZT hell/dunkel- Zellvariationen; kaum Pb- Niederschläge
------------------------------------	--

Tabelle 3

MW-Bestrahlung oder Immersion bei ZT in GA mit verschiedenen 0.1 molaren Puffern, mit oder ohne Ca, Mg oder FA, anschliessend Osmiumfixation im gleichen Puffer.

Puffer, Zusätze hauptsächlich Effekte in den Randzonen

A) Mikrowellenbestrahlung in 2,5% GA

Caco	-	-Me Rupturen; Mi ohne Cristae; wenig SER; G kaum zu sehen
Cacc	- a)	-Me wenig Rupturen; Mi, RER gut erhalten; wenig SER, G nur selten zu sehen
Caco	Ca/Mg b)	-Me kaum Rupturen; alle Organellen gut erhalten; Glykogen kaum kontrastiert
NaKP	-	-Me kaum Rupturen; alle Organellen gut erhalten; G stark kontrastiert; SER deutlich

B) Mikrowellenbestrahlung in 1% GA

Cacc	-	-ZP teilweise herausgelöst; Me Rupturen; G kaum zu sehen
PIPES	-	-wie oben; viele Rupturen
NaKP	-	-Me deutlich, wenig Rupturen; Mi kaum Cristae; RER deutlich; wenig SER; G deutlich
Caco	2% FA	-Me unscharf, viele Rupturen
PIPES	2% FA	-wie oben
NaKP	2% FA	-Me unscharf, viele Rupturen; G gut sichtbar

C) Immersion in 2,5% GA bei ZT

Caco Ca/Mg b) -RER deutlich; wenig SER; Mi wenig Cristae; G nicht zu sehen

D) Immersion in 2,5% GA bei 4 Grad Celsius

Caco - -Me wenig Rupturen; Mi ohne Cristae; RER deutlich; wenig SER;

G wenig kontrastiert

PIPES - -Me vermehrt Rupturen; ZP teilweise aufgelockert; G schlecht kontrastiert

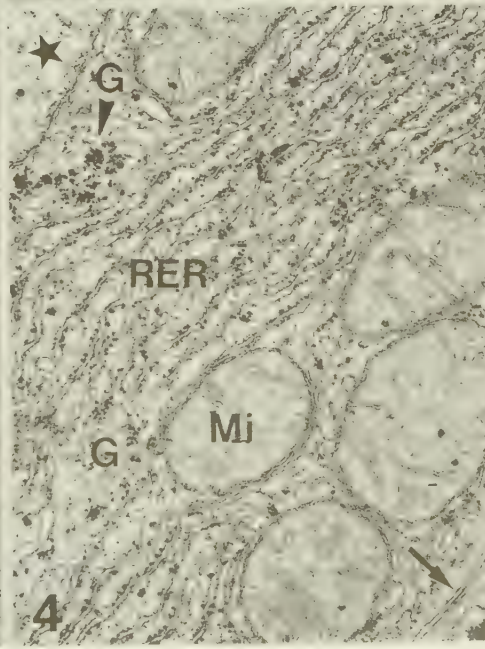
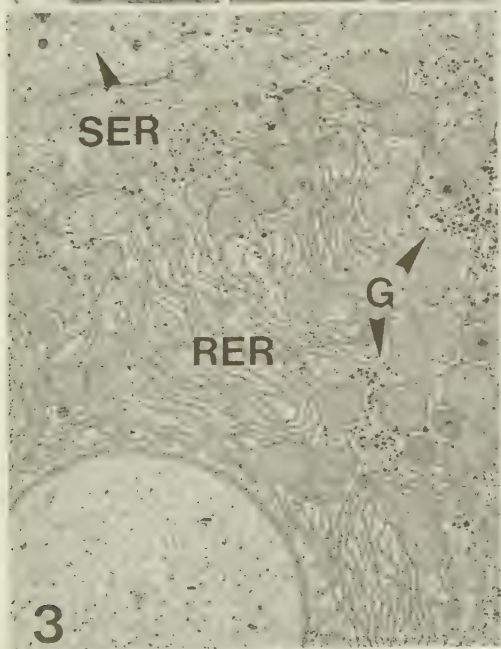
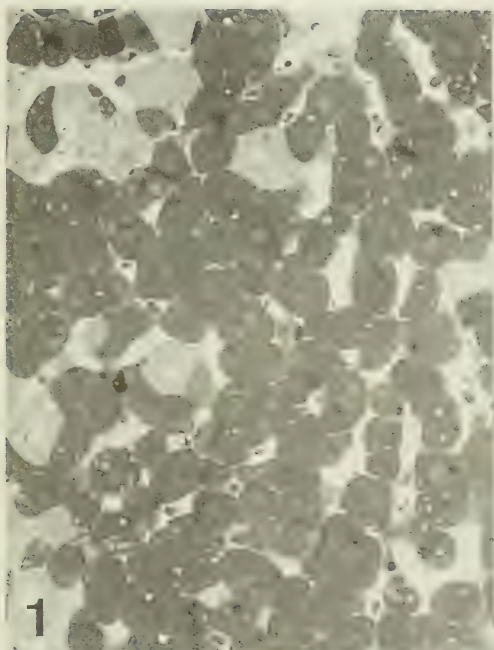
NaKP - -Me Rupturen; RER deutlich; wenig SER; G gut zu sehen

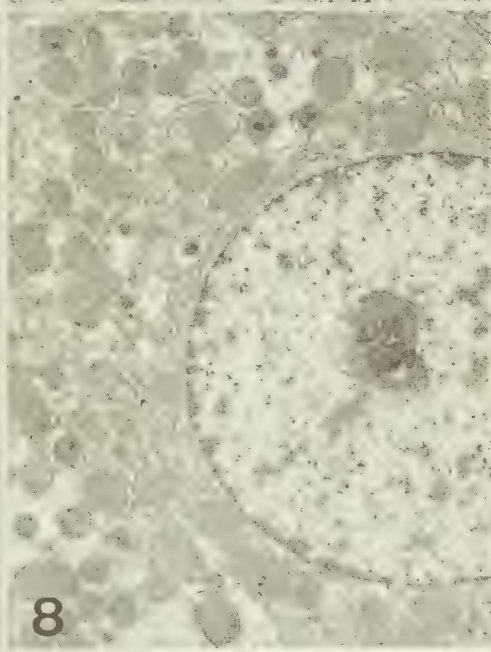
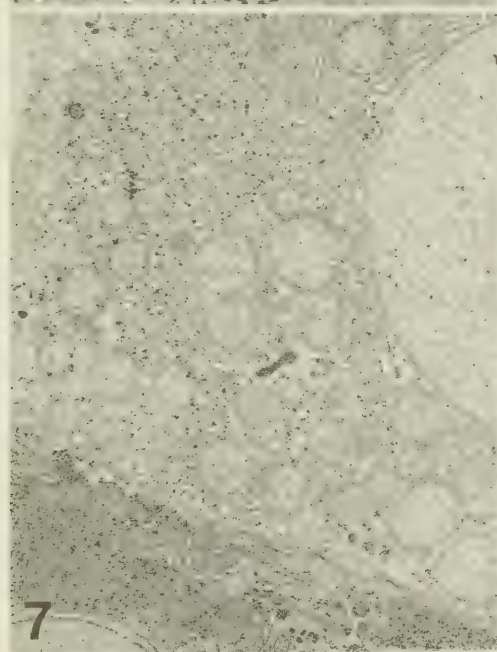
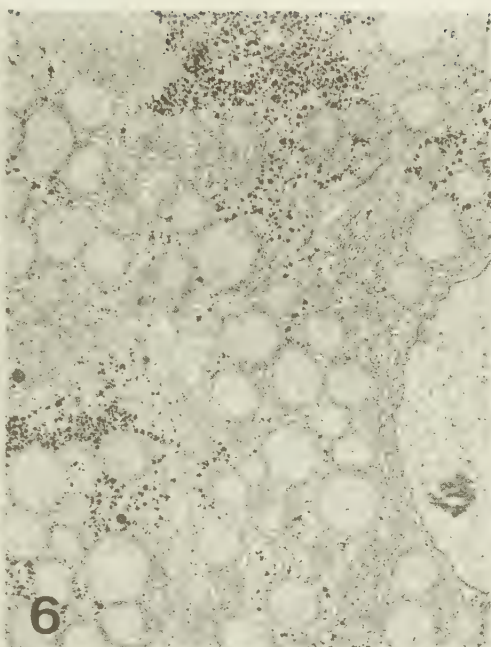
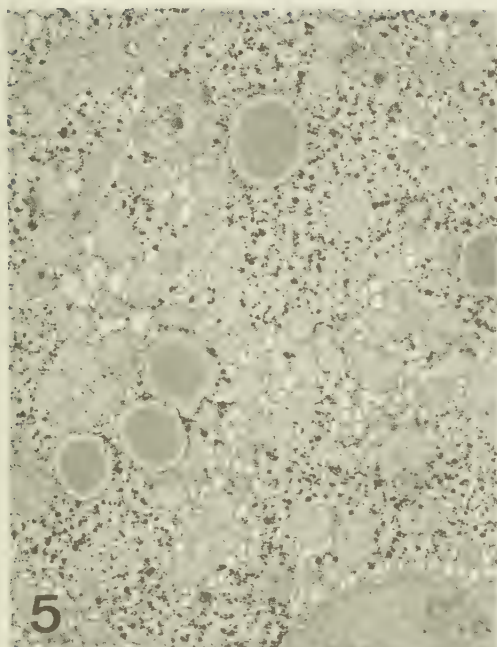
a): Os in 0,1M Caco mit 0,25mM Ca und 0,5mM Mg

b): Konzentrationen: 0,25mM Ca, 0,5mM Mg

Liste der verwendeten Abkürzungen

Be	Berylliumchlorid, BeCl_2
Ca	Kalziumchlorid, CaCl_2
Caco	Natriumcacodylatpuffer, pH = 7,4
FA	Formaldehyd
G	Glykogen
GA	Glutaraldehyd
KF	Karnovsky-Fixativ
KS	Kaliumsulfat, K_2SO_4
LM	Lichtmikroskop
M	molar
Me	intrazelluläre Membranen und Zellmembran
Mg	Magnesiumchlorid, MgCl_2
Mi	Mitochondrien
MW	Mikrowellen
mM	millimolar
NaKP	Natrium/Kalium-Phosphatpuffer, pH = 7,4
NaP	Natriumphosphatpuffer, pH = 7,4
Os	Osmiumtetroxid
RER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
SER	glattes endoplasmatisches Retikulum und Golgi
UD	Ultradünnschnitt
ZP	Zytoplasma
ZT	Zimmertemperatur





Abbildungen

- Abb. 1 Besonders ausgeprägte Unterschiede in der Anfärbbarkeit der Zellen mit Toluidinblau (2 Sekunden MW-Bestrahlung in 5ml 0,1M NaKP; Os in gleichem Puffer).
Vergrößerung 320 x
- Abb. 2 Deutliche Abnahme der Fixationsqualität vom Rand der Probe (unten) zum Zentrum (oben) hin. Zwei bis drei Zellreihen sind ausgezeichnet fixiert, ca. zehn Reihen befriedigend (10 Sekunden MW-Bestrahlung in 2,5% GA in 0,1M Caco, Os in 0,1M Caco mit 0,25mM Ca und 0,5mM Mg).
Vergrößerung 130 x
- Abb. 3 10 Sekunden MW-Bestrahlung in 0,1M NaKP; Os in gleichem Puffer. Me fein gezeichnet, gut erhalten, aber gewellt; Mi mit deutlichen Cristae; G gut kontrastiert. Besonders ist die homogene Verteilung des Chromatins im Kern.
Vergrößerung 5000 x
- Abb. 4 Ausschnitt aus Abb. 3.
Pfeil: Zellmembran. Stern: Kern mit Kernmembran.
Die Membranen sind gewellt.
Vergrößerung 23000 x
- Abb. 5 Fünf Minuten Immersion bei Zimmertemperatur in 0,1M NaKP, anschliessend Os in gleichem Puffer. Ohne MW-Bestrahlung kommt es stellenweise zum vollständigen Zusammenbruch der Zellstruktur.
Vergrößerung 5000 x

- Abb. 6 Gleiches Präparat wie Abb. 5, an einer anderen Stelle:
recht gute Fixation. Me gewellt; G gut kontrastiert;
ähnlich wie Abb. 3.
Vergrößerung 5000 x
- Abb. 7 10% Saccharose + 1mM Bleinitrat, ohne MW-Bestrahlung
fünf Minuten Immersion bei Zimmertemperatur, anschlies-
send Os in 0,1M NaKP. Aehnlich wie Abb. 3; grosse
Strukturvielfalt, Me intakt. Starke hell/dunkel- Zell-
variationen.
Vergrößerung 5000 x
- Abb. 8 Eine Stunde Immersion bei Zimmertemperatur in 2,5% GA
in 0,1M Caco mit 0,25mM Ca und 0,5mM Mg, Os in gleichem
Puffer. Me intakt; Chromatinklumpen im Kern; G kaum zu
sehen; wenig SER.
Vergrößerung 5000 x

5 Diskussion

Da niemand mit Sicherheit weiss, wie das Innere einer lebenden Zelle im elektronenmikroskopischen Bereich aussieht, kann es die allein richtige Fixation gar nicht geben. Erst wenn wir viele verschiedene Proben verglichen haben, können wir beginnen, uns ein mögliches Bild von den Ultrastrukturen zu machen. Es ist wichtig, unsere Ergebnisse ständig zu hinterfragen. So können wir plötzlich feststellen, dass Beobachtungen, denen wir eine physiologische Bedeutung zugeschrieben haben, sich in Wirklichkeit als Fixationsartefakte entpuppen (z.B. Wild et al., 1987).

Parallel zu den sinkenden Preisen für die modernen Mikrowellengeräte läuft deren rasante Verbreitung. Nicht nur in der Küche, auch im Labor werden sie vermehrt angewendet. In der Medizin werden heute Diagnosen in immer kürzerer Zeit erwartet. Eine Verkürzung der Verarbeitungszeit der Proben ist deshalb wünschbar. Mit dem Einsatz von Mikrowellen lassen sich die Fixationszeiten von Stunden auf Minuten reduzieren. Im weiteren benutzt man Mikrowellen zur Beschleunigung von verschiedenen Verarbeitungsschritten wie Färben, Kontrastieren, Immunkomplexbildung, Trocknen, Polymerisation der Einbettungsmedien und Dehydrieren (Chiu, 1986; Mc Lay et al., 1987; Hopwood et al., 1984; Boon und Kok 1987).

Als Modell für unsere Versuche verwendeten wir frische Rattenleberzellen. Rattenlebern sind einfach, schnell und ohne starke Gewalteinwirkungen auf das Gewebe zu präparieren. Der Aufbau ist für das ganze Organ homogen, so dass sichere Aussagen über die Fixationstiefe zu machen sind. Zudem handelt es sich um ein relativ grosses Organ, was eine Vielzahl von Proben vom gleichen Tier ermöglicht, wodurch die Proben direkt miteinander verglichen und die Zahl der verwendeten Ratten klein gehalten werden können.

Die ersten Versuche einer Hitze-fixation mit Mikrowellen führte Mayers (1970) durch. Er fixierte Würfel mit 1 cm Kantenlänge in einem Hohlleiter mit 75 Watt während 90 Sekunden, ohne die Würfel in eine Pufferlösung zu legen. Ueber die erreichten Temperaturen machte er keine Angaben. Am Beispiel der Niere erhielt er licht-mikroskopisch befriedigende Resultate.

Bernard (1974) fixierte anästhesierte Mäuse mit Mikrowellen. Er fand für jedes Organ eine optimale Fixationstemperatur, z.B. für Leber 70 °C, für Niere und Lunge 77 °C und für Hoden 85 °C.

Allerdings mass er diese Temperaturen unmittelbar nach der Bestrahlung für die ganze Maus in einem Kalorimeter, also nicht die effektiven Temperaturen der einzelnen Organe. Wie stark dabei das Heizpotential innerhalb eines Körpers variieren kann, zeigte Hand (1977) anhand von Modellen. Es handelt sich dabei um Kugeln mit drei konzentrischen Schichten. Sein kleinstes Modell stellt eine stark vereinfachte Maus dar, der Radius beträgt 20 mm. Die äusserste Schicht mit der Dicke von 1 mm hat die Eigenschaft von Haut, darauf folgt eine dünne Lage Fett, das Zentrum mit dem Radius von 18,5 mm entspricht der Muskulatur. Bestrahlt man eine solche "Maus" mit Mikrowellen (Frequenz 2450 MHz) so kommt es zur grössten Erwärmung im Innersten (Radius rund 5 mm) der Muskelschicht, mit einem starken Abfall des Heizpotentials nach aussen bis auf ca. einen bis zwei Fünftel des Ausgangswertes. In der dünnen Fettschicht kommt es nochmals zu einer solchen Abnahme um etwa den gleichen Faktor. Da Fettgewebe relativ wenig Wasser enthält, überrascht die geringe Erwärmung dieser Schicht nicht. Die Hautsphäre hat dann wieder etwa das Heizpotential der äusseren Muskelschichten. Es ist zu erwarten, dass bei einer richtigen Maus mit viel grösserer Vielfalt des Aufbaues die Temperaturverteilung noch weniger homogen ist als im Modell. Viele Autoren erwähnen die Resultate von Bernard, ohne die inhomogene Verteilung der Absorption und die daraus resultierenden Temperaturschwankungen zu diskutieren. Für ihre eigenen Versuche bevorzugen sie jedoch wie wir Temperaturen der Pufferlösung im Bereich von 50-60 °C (Hopwood et al., 1984; Leong et al., 1985; Login und Dvorak 1985).

In unseren Proben bestimmten wir die Temperatur jeweils unmittelbar im Anschluss an die Mikrowellenbestrahlung mit einem schnell reagierenden elektronischen Thermometer. Indem wir die Gläschen rasch herausnahmen, die Temperatursonde zügig eintauchten und einmal hin- und herbewegten, kam es zu einer Durchmischung der 10 ml Puffer- respektive Fixationslösung, so dass wir die ungefähre Durchschnittstemperatur ablesen konnten.

Bei einer möglichst turbulenzfreien Ausmessung der Temperaturverteilung innerhalb des Gläschens fanden wir die höchsten Werte im Zentrum der Lösung, mit einer gleichmässigen Abnahme gegen aussen und gegen den Boden hin um 8-12%. Die Ursache ist die Kühlung durch das Glas, welches sich in Mikrowellen nicht erwärmt. Zusätzlich möglich ist eine direkte stärkere Erwärmung des Zentrums, ähnlich der, welche Hand (1977) bei seinem kleinsten Modell fand, sowie eine stärkere Bestrahlung auf dieser Höhe bedingt durch die Reflexionen der Strahlen am Boden des Mikrowellenofens.

Diese Methode der Temperaturmessung hat verschiedene Nachteile. Will man auf eine bestimmte Temperatur erhitzen, so muss man zuerst die dafür nötige Bestrahlungszeit herausfinden. Interessanter wäre eine gleichzeitige Messung, möglichst nicht des Puffers, sondern direkt der Probe selbst, um das Gerät abstellen zu können, sobald die gewünschte Temperatur erreicht ist.

Einige Mikrowellenofen verfügen zu diesem Zweck über die Möglichkeit, eine mitgelieferte Temperatursonde im Innern anzuschliessen. Deren Anwendung ist für Laborzwecke nicht zu empfehlen. Alle metallenen Gegenstände im Innern des Ofens verändern die elektromagnetischen Felder völlig. Zudem ist eine Erwärmung der Sonde selbst möglich, so dass gravierende Fehlmessungen die Folge sind (Constable et al., 1987). Zudem sind diese Sonden sehr träge, so dass damit insbesondere kleine Probenmengen viel weniger exakt erhitzt werden als bei der Zeitmessung. Eine bessere Möglichkeit wäre, mikrowellenneutrale Glasfasertemperatursonden zu verwenden. Allerdings sind deren Kosten um ein Mehrfaches höher als die des Mikrowellenofens selbst.

Aus den oben erwähnten Gründen messen die meisten Autoren die Temperatur erst nach der Bestrahlung auf eine ähnliche Art wie wir. Bei den Versuchen, welche wir mit einem anderen Gerät am Institut für Hochfrequenztechnologie der ETH Zürich durchführten, erhielten wir bei gleichen Temperaturen ähnliche Resultate.

Wenn mit der Zeit gearbeitet wird, ergeben sich Nachteile, weil beim Miele M 696 (und bei anderen Geräten) die im Magnetron erzeugten elektromagnetischen Wellen über einen Hohlleiter auf einen Aluminiumpropeller mit ganz unregelmässig geformten Flügeln geleitet werden. Dieser Feldverteiler hat die Aufgabe, die auftreffende Strahlung zu reflektieren und möglichst stark zu streuen. Schaltet man das Gerät ein, so wird der Feldverteiler durch ein Gebläse langsam in Drehung versetzt. Durch eine gewisse Reaktionszeit kann es so vor allem beim Start zu einer lokal stark unterschiedlichen Energieverteilung kommen.

Kleinere systemische Fehler gibt es z.B. auch durch die minimalen Zeitdifferenzen beim Einschalten des Magnetrons nach drücken der "Start"-Taste, sowie durch Netzschwankungen.

Wählt man nun eine zu kurze Bestrahlungsdauer, so erreicht man keine konstante Endtemperatur. Deshalb erhöhten wir die Puffermenge nach einigen Vorversuchen von 5 ml auf 10 ml. Damit erzielten wir eine grössere Genauigkeit, so dass für alle Versuche die Temperaturschwankungen innerhalb von 5 °C zu liegen kamen, sofern wir die Gläschen immer auf die gleiche Position im Ofen stellten. Obwohl man so recht konstante Puffertemperaturen erreicht, sind die qualitativen Schwankungen der Fixierung immer noch beträchtlich, und zwar sowohl beim Vergleich von Proben mit gleicher Verarbeitungsweise wie auch innerhalb einer Probe.

Eine mögliche Ursache ist die Entstehung von thermischen Mikrogradienten in einer bestrahlten Zelle, wie sie Chen und Lin (1978) erwähnen. Berücksichtigt man den stark inhomogenen Aufbau auf molekularer Ebene, so wird klar, dass sich die Temperatur auch mit Mikrowellenerwärmung innerhalb der Zellen über kürzeste Distanzen durch Konvektion verteilen muss.

Die qualitativen Schwankungen und die diversen Faktoren, welche sich vor allem beim Verwenden von konventionellen Mikrowellenöfen einer direkten Kontrolle entziehen, machen die Anwendung von Mikrowellen in der Elektronenmikroskopie schwierig. Zudem haben einige Vergleichsversuche mit anderen Proben, z.B. Nerven, Darm, Nebenschilddrüse ergeben, dass für eine optimale Erhaltung der Ultrastrukturen anderer Organe die für die Leber gefundenen Ergebnisse nicht unbedingt übernommen werden können.

Die Mikrowellenbestrahlung vermag zur Zeit die bisherigen Methoden aus den erwähnten Gründen nicht zu ersetzen. Diese Ansicht teilen auch andere Autoren (Stavinoha 1983, Hopwood et al., 1984). Andererseits erreicht man mit einer Mikrowellenbestrahlung insbesondere in Na-K-Phosphat ein anderes Zellbild mit einer stellenweise äusserst vielfältigen Erhaltung der Ultrastruktur. Damit ist das sicher eine wertvolle Ergänzung.

Versuche, die bestehenden Nachteile auszumerzen, gibt es z.B. mit ausgeklügelter Anordnung zur Mikrowellenbestrahlung (Login und Stavinoha, 1986).

Vergleicht man gleiche Pufferkombinationen mit und ohne Mikrowellenbestrahlung, so zeigt sich, dass Mikrowellen einen relativ geringen Einfluss auf die Erhaltung der Ultrastruktur haben. Demgegenüber vermögen Aldehyde und vor allem verschiedene Puffer das Bild sehr stark zu verändern. Bei der Verwendung von Aldehyden während der Mikrowellenbestrahlung sieht man einen starken Unterschied zwischen Zentrum und Rand der Probe. Das dürfte die Folge der bescheidenen Diffusions- und Fixationsgeschwindigkeiten der Fixative sein. Selbst bei 50 °C sind für Formaldehyd immer noch einige Stunden Einwirkzeit für eine vollständige Fixation nötig (Fox et al., 1985). Damit beschränkt sich die Formaldehydwirkung auf eine Erhöhung der Osmolarität, was nicht a priori erwünscht ist. Bei unseren Versuchen erwies sich die Zugabe von 2% FA zu 1% GA der alleinigen Verwendung von Glutaraldehyd denn tatsächlich als unterlegen.

Das in Kombination mit einer Mikrowellenbestrahlung am häufigsten verwendete Fixationsgemisch ist das Karnovsky Fixativ, das meist neben 2,5% Glutaraldehyd in 0,1M Na-Cacodylat mit 0,025% Kalziumchlorid noch 2% (oder mehr) FA enthält.

Verwendet man Osmiumtetroxid zusammen mit Na-Cacodylat, so fällt auf, dass das Glykogen nicht oder nur schwer zu erkennen ist. Dabei wurde es nicht etwa bei der Verarbeitung der Proben herausgelöst. Eine PAS-Färbung zeigt, dass das Glykogen vorhanden ist. Offenbar wird in diesem Fall die Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleinitrat durch Na-Cacodylat erschwert.

Es zeigte sich, dass ohne Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid die Mikrowellenbestrahlung alleine noch keine Fixation bewirkt. Für den beobachtbaren deutlichen positiven Effekt ist deshalb der Ausdruck Mikrowellen-Stabilisation anstelle von Mikrowellen-Fixation vorzuziehen (Boon und Kok, 1987).

Umstritten ist, ob Mikrowellen die Ultrastrukturen direkt beeinflussen, oder ob es sich dabei nur um eine besonders raffinierte Möglichkeit handelt, die Proben schnell zu erwärmen.

Wird die Temperatur während der Mikrowellenbestrahlung durch ein Eisbad konstant gehalten, so wird weder die Fixation noch die Penetration von Fixativen verstärkt (Hopwood et al., 1988). Da Angaben über die von der Probe absorbierte Energie fehlen, können keine Schlüsse über den direkten Einfluss der Mikrowellen gemacht werden. Es ist denkbar, dass die Mikrowellen grosstenteils durch das Eis absorbiert wurden.

Die Bindungskräfte, welche die höheren räumlichen Strukturen von Makromolekülen verursachen, sind rund sieben Zehnerpotenzen höher als die Energie eines Photons:

Energie eines Photons (2450 MHz): $1,62 \times 10^{-24}$ J

Energie von "van der Waals"-Bindungen, Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen (Watson et al., 1987):

ca. 4-12 kJ pro Mol, d.h. rund $0,7-2 \times 10^{-17}$ J pro Bindung.

Trotzdem halten einige Autoren nichtthermische Effekte durch eine Beeinflussung dieser Bindungen für möglich (Ortner et al., 1981).

Darüber, ob Mikrowellen neben der thermischen noch spezifische elektrische und elektromagnetische Wirkungen haben, gibt es trotz umfangreichster Forschung grosse Meinungsverschiedenheiten.

Die Diskussion beschränkt sich dabei nicht nur auf Mikrowellen, sondern erstreckt sich beinahe über das gesamte elektromagnetische Spektrum. Wegen der weiten Verbreitung von Wellen wie Radar, Radio, Funk usw., die zu keiner Erwärmung führen und die wir nicht direkt wahrnehmen können, ist es in der Medizin noch wichtiger zu wissen, ob eventuelle nichtthermische Effekte z.B. zu Langzeitschäden führen können. Entsprechend zahlreich sind die veröffentlichten Arbeiten. Wegen der Schwierigkeit, irgendwelche Effekte zu messen ohne das Experiment wesentlich zu beeinflussen, können Resultate nur verglichen werden, wenn die Methode genau nachvollziehbar ist. Dazu fehlen in vielen Arbeiten die nötigen Angaben (Stavinoha, 1983). Langzeiteffekte können unter den zeitlich limitierten Laborbedingungen ohnehin nur simuliert werden. Insgesamt ist die Situation für den Mikrowellenforscher unbefriedigend. Dass das nicht nur ein persönlicher Eindruck ist, zeigt die Forderung von Foster und Pickard (1987) nach einheitlichen Richtlinien für die Mikrowellenforschung, um weitere Auswüchse zu stoppen.

Bis heute gibt es keine Beweise für nichtthermische Effekte. Das Gegenteil lässt sich natürlich erst recht nicht beweisen, weshalb allgemein die Empfehlung gilt, unnötige Bestrahlung zu vermeiden. (Suess, 1982).

Unsere mit Mikrowellen oder im Wasserbad erwärmten Proben zeigten deutliche Unterschiede. Deswegen auf nichtthermische Wirkungen zu schliessen, wäre gewagt, erfolgt doch die Erwärmung im Wasserbad durch Konvektion von aussen nach innen, währenddem mit Mikrowellen die ganze Probe gleichzeitig in viel kürzerer Zeit erhitzt wird. Darum ist die Erwärmung mit Mikrowellen jener im Wasserbad überlegen.

Biologische Gewebe sind magnetisch neutral, für die Erwärmung ist somit die elektrische Komponente des Mikrowellenfeldes verantwortlich (Schneider et al., 1981; Grant 1982; Boon und Kok 1987). Trotzdem "tunen" Stavinocha (1983) und Ikarashi et al. (1986) ihren speziell konstruierten Mikrowellenofen derart, dass das magnetische Feld am Ort, an dem die Probe bestrahlt wird, maximal ist. Dadurch erreichen sie homogenere Resultate.

Die Frage stellt sich, ob die magnetischen Felder eine spezifische Wirkung haben:

Bei den sich transversal ausbreitenden Mikrowellen sind die beiden Felder untrennbar und stehen senkrecht zueinander. Die absorbierte Energie ist proportional zum Quadrat des elektrischen Feldes (Grant, 1982), dessen Änderungen sich daher sofort deutlich auswirken. Richtet man das magnetische Feld auf die Längsachse der Probe aus, so kommt das elektrische Feld quer zu dieser zu liegen und hat deshalb weniger Wirkung. Für gleiche Endtemperaturen werden längere Bestrahlungszeiten nötig, was möglicherweise eine homogenere Erwärmung - und homogenere Resultate - zur Folge hat.

Mit dem gezielten Einsatz von Mikrowellen können in wesentlich kürzerer Zeit viele Organe besser fixiert werden als mit konventionellen chemischen Fixationen. Dies gilt sowohl für die Licht- wie auch für die Elektronenmikroskopie (Boon und Kok, 1987; Wild et al., 1988).

Eine optimale Strukturhaltung erreicht man allerdings nur durch eine Mikrowellenbestrahlung in gepufferten Aldehydlösungen. Dabei werden unter diesen Bedingungen jedoch nur ein paar Zellagen an der Peripherie der Gewebeproben vollständig fixiert.

Da vor allem glattwandige Membranen besser erhalten werden, eignet sich diese Methode für vergleichende Untersuchungen mit dem Ziel, wirklichkeitsgetreuen Abbildungen zellulärer Strukturen näher zu kommen.

6 Literatur

- 1 Bernard G.R., 1974. Microwave irradiation as a generator of heat for histological fixation. *Stain Technol* 49:215-224.
- 2 Boon M.E., Kok L.P., 1987. Microwave cookbook of pathology. Coulomb Press Leyden, Leiden.
- 3 Chen K.-C., Lin C.-J., 1978. A system for studying effects of microwaves on cells in culture. *J Microwave Power* 13:251-256.
- 4 Chiu K.Y., 1987. Use of microwaves for rapid immunoperoxidase staining of paraffin sections. *Med Lab Sci* 44:3-5.
- 5 Constable R.T., Dunscombe P., Tsoukatos A., 1987. Perturbation of the temperature distribution in microwave irradiated tissue due to the presence of metallic thermometers. *Med Phys* 14:385-388.
- 6 Foster K. R., Pickard W. F., 1987. Microwaves: the risks of risk research. *Nature* 330:531-532.
- 7 Fox C.H., Johnson F.B., Whiting J., Roller P.P., 1985. Formaldehyde Fixation. *J Histochem Cytochem* 33:845-853.
- 8 Grant E.H., 1982. Interaction of radiowaves and microwaves with biological material. *Br J Cancer* 45:1-4.
- 9 Hand J.W., 1977. Microwave heating patterns in simple tissue models. *Phys Med Biol* 22:981-987.
- 10 Hayat, M.A., 1981. Fixation for electron microscopy. Academic Press, New York.
- 11 Höfling O., 1962. Lehrbuch der Physik, 5. Auflage. Ferd. Dummlers Verlag, Bonn.

- 12 Hopwood D., Coghill G., Ramsay J., Milne G., Kerr M., 1984. Microwave fixation: its potential for routine techniques. histochemistry, immunocytochemistry and electron microscopy. *Histochem J* 16:1171-1191.
- 13 Hopwood D., Milne G., Yeaman G., 1988. The role of temperature in microwave fixation: effects on formaldehyd-protein fixation. *Proc RMS* 23:43.
- 14 Ikarashi Y., Okada M., Maruyama Y., 1986. Tissue structure of rat brain after microwave irradiation using maximum magnetic field component. *Brain Res* 373:182-188.
- 15 Leong A.S.-Y., Daymon M.E., Milios J., 1985. Microwave irradiation as a form of fixation for light and electron microscopy. *J Pathol* 146:313-321.
- 16 Lin H.P., Sommerfeld M.R., 1978. Stabilization of cytomembranes in red algae during ultrastructural fixation with calcium chloride. *Trans AMS* 97:94-100.
- 17 Login G.R., 1978. Microwave fixation versus formalin fixation of surgical and autopsy tissue. *Am J Med Technol* 44:441-442.
- 18 Login G.R., Dvorak A.M., 1985. Microwave energy fixation for electron microscopy. *Am J Pathol* 120:230-243.
- 19 Login G.R., Stavinoha W.B., Dvorak A.M., 1986. Ultrafast microwave energy fixation for electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 34:381-387.
- 20 Lowe D.A., 1975. Guide pour l'utilisation du système international d'unités (SI). *Ergänzung zum WHO-Bulletin* 52.
- 21 Marti R., Wild P., Schraner E.M., Mueller M., Moor H., 1987. Parathyroid ultrastructure after aldehyde fixation, high-pressure freezing, or microwave irradiation. *J Histochem Cytochem* 35:1415-1424.

- 22 Mayers C.P., 1970. Histological fixation by microwave heating. J Clin Pathol 23:273-275.
- 23 Mc Lay A.L.C., Anderson J.D., Mc Meekin W., 1987. Microwave polymerisation of epoxy resin: rapid processing technique in ultrastructural pathology. J Clin Pathol 40:350-352.
- 24 Michaelson S.M., 1982. Microwave irradiation. In Suess M.J., Nonionizing radiation protection. WHO regional publications, European series Nr. 10.
- 25 Ortner M.J., Galvin M.J., Chignell C.F., Mc Ree D.I., 1981. A circular dichroism study of human erythrocyte ghost proteins during exposure to 2450 MHz microwave radiation. Cell Biophys 3:335-347.
- 26 Robards A.W., Sleytr U.B., 1985. Low temperature methods in biological electron microscopy. In Glauert A.M., Practical methods in electron microscopy 10, Elsevier, Amsterdam.
- 27 Schneider D.R., Felt B.T., Goldman H., 1981. Minireview. Microwave radiation energy: a probe for the neurobiologist. Life Sci 29:643-653.
- 28 Stavinoha W.B., 1983. Study of brain neurochemistry utilizing rapid inactivation of brain enzyme activity by heating with microwave irradiation. In Blank C.L., Stavinoha W.B., Maruyama Y., Microwave fixation of labile metabolites. Adv Biosci 45:1-12.
- 29 Suess M.J., 1982. Nonionizing radiation protection. WHO regional publications, European series Nr.10.
- 30 Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J.W., Steitz J.A., Weiner A.M., 1987. Molecularbiology of the gene. Fourth edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California.

- 31 Wild P., Bertoni G., Schraner E.M., Beglinger R, 1987a.
Influence of calcium and magnesium containing fixatives on the
ultrastructure of parathyroids.
Micron Microsc Acta 18:259-271.
- 32 Wild P., Kellner S.J., Schraner E.M., 1987b. Parathyroid cell
variants may be provoked during immersion fixation.
Histochemistry 87:263-271.
- 33 Wild P., Krähenbühl M., Schraner E.M., 1988. Does microwave-
stimulated fixation improve the preservation of the ultra-
structure.
Verh Anat Ges, Zürich.

Lebenslauf

Markus Krähenbühl von Trub (BE),

14.6.1960	geboren in Männedorf
1967-1975	Primar- und Sekundarschule in Uetikon
1975-1979	Mathematisch Naturwissenschaftliches Gymnasium Rämibühl Zürich, Maturtypus C
1979-1986	Studium an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich mit Abschluss als Tierarzt im Mai 1986
1986-1987	Tierarzt am Micarna-Schlachthof in Bazenheid (50%-Stelle), daneben Teil- zeitassistent am Institut für Patho- logie und am Institut für Anatomie am Tierspital Zürich
1988	Seit 1. März als Tierarzt im Gesund- heits- und Wirtschaftsamt der Stadt Zürich

Verdankungen

Als Peter Wild mir zum erstenmal den Rahmen dieser Arbeit erläuterte, hat er wohl gleich gemerkt, dass mit mir eher einen Bergpreis als einen Nobelpreis zu holen ist. Dass er mir das Thema trotzdem überlassen hat, zeugt von seinen vielseitigen Interessen. Sehr geschätzt habe ich die weitgehenden Freiheiten in der Gestaltung, die hilfreiche, doch unaufdringliche Anleitung während der Arbeit und das vertrauensvolle zur Verfügung stellen von sehr teuren und heiklen Apparaten. Dafür und für seine Freundschaft danke ich ihm und wünsche ihm noch manchen so guten Doktoranden.

Die Herren Prof. Dr. J. Frewein und Prof. Dr. A. Pospischil haben freundlicherweise das Referat bzw. das Korreferat übernommen und mit ihren prompten und sehr sorgfältigen Korrekturen das Niveau dieser Arbeit nochmals erhöht.

Dank dem grossen Einsatz von Frl. Elisabeth Schraner beim pipettieren, schneiden, färben, kontrastieren und joggen kam ich zu meinen Resultaten, wir beide zu einer schönen Wohnung und Peter zu einem Guthaben von 18 Flaschen Wein.

Herr H. Benedikter vom Institut für Feldtheorie und Höchstfrequenztechnik der ETH Zürich hat uns spontan bei einem aufschlussreichen Vergleichsversuch geholfen und uns einen Einblick in die moderne Mikrowellentechnik ermöglicht.

Da ich für die Textverarbeitung einen PC benützte, dauerte zuerst alles doppelt so lange. Dass dieser die eingegebene Arbeit schlussendlich auf Papier herausrückte, verdanke ich meinem Bruder Hansruedi, der mir nicht nur den PC zur Verfügung stellte, sondern auch half, die Schimpfwörter in Computerbefehle zu übersetzen.

Gedruckt wurde das vollendete Werk durch meinen Vater in der Druckerei Genossenschaft Felicitas.

Im weiteren danke ich Herrn Prof. R. Wyler und allen Mitarbeitern am Institut für Virologie, die mit ihrer Gastfreundschaft ebenso zu einem abwechslungsreichen Betrieb beitrugen wie Ursi und Stöffli mit ihren diversen Aktionen.

